

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
EINES LIPASE-INHIBITORS AUS
RICINUS

1976

Harald Becker

Aus der Hals-Nasen-Ohrenklinik der Universität München
Direktor (Vorstand): Prof. Dr. H. H. Naumann

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
EINES LIPASE-INHIBITORS AUS
RICINUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Harald Becker
aus Offenbach

1976

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. K. Hochstraßer
Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. H. Naumann

Dekan: Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 27. 1. 1976



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A) Einleitung	1
B) Theoretischer Teil	
I. Pathogenese der akuten Pankreatitis	2
II. Enzyminhibitoren	4
III. Die Pankreaslipase, eine Carboxyl- ester-Hydrolase	6
Experimenteller Teil	
C) Ergebnisse	9
D) Material	10
E) Methodik	
I. Herstellung der Gebrauchslösungen	11
II. Kinetischer Test zur Bestimmung der Enzymaktivität	12
III. Gewinnung des Lipidrohextrakts	14
IV. Bestimmung der inhibitorischen Wirkung des Gesamtlipidextrakts aus Ricinus	14
V. Versuche zur Isolierung des Hemmstoffes	17
F) Versuche zur Charakterisierung des Hemm- stoffes	35
I. Phospholipidnachweis	35
II. Alkalische Hydrolyse	36
G) Schlußbemerkung	38



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555611_0028

A) EINLEITUNG

Während man früher den Proteasen und von diesen vor allem dem Trypsin die Hauptbedeutung an der Entstehung der akuten Pankreatitis zuschrieb, kann man nach neueren Untersuchungen die Pankreaslipase und die Phospholipase A dafür verantwortlich machen. Aus diesem Grunde ist man auf der Suche nach Hemmstoffen für diese Enzyme.

In Vogeleiern und eiweißreichen Pflanzensamen werden Proteaseninhibitoren gefunden, die die als Vorratsstoffe gespeicherten Proteine vor unphysiologischem proteolytischem Abbau schützen sollen. Es liegt deshalb die Vermutung nahe, in fettreichen Pflanzensamen, denen Lipide als Vorratsstoffe dienen, einen Inhibitor zu finden, der die Lipaseaktivität zu hemmen vermag. So konnten bereits Hochstraßer und Feuth (9) in früheren Arbeiten in den Lipidextrakten von Erdnuß- und Mohnsamen eine antilipolytische Wirkung feststellen, den Hemmstoff isolieren und charakterisieren.

Diese Arbeit hat zum Ziel, einen Inhibitor aus dem Lipidextrakt von Ricinus zu isolieren und, soweit wie möglich, zu charakterisieren.

B) THEORETISCHER TEIL

I. Pathogenese der akuten Pankreatitis

Die akute Pankreatitis zeichnet sich durch ihre typisch pathologisch anatomischen Befunde aus: Fettgewebnekrosen, Pankreasparenchymnekrosen, Ödeme und Hämorrhagien. Als ihre Ursache gilt die Autodigestion des Pankreas (1,8,26).

Das Pankreas bildet eine Reihe von Enzymen für die Verdauung von Eiweißen, Fetten und Kohlenhydraten.

Sekretenzyme des Pankreas (2):

1. Esterasen: Lipase, Cholinesterase, Lecithinase, Lipoproteinlipase (?), Cholesterolesterase (?)
2. Glycosidasen: α -Amylase, β -Galaktosidase (?)
3. Peptidasen: Trypsinogen, Chymotrypsinogen, Procarboxypeptidase, Kollagenase, Elastase
4. Nucleasen: Ribonuclease, Desoxyribonuclease

Die Proteasen Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Kallikrein werden in inaktiver Form sezerniert und erst im Duodenum durch die Enterokinase in die aktive Form übergeführt (3).

Die autokatalytische Aktivierung dieser Proteasen hat man bis vor kurzem für die Autodigestion des Pankreas verantwortlich gemacht. Es werden jedoch mit den Zymogenen Trypsininhibitoren sezerniert, die als Schutzmechanismen eine temporäre Hemmung aktivierter Proteasen bewirken, wodurch unter normalen Verhältnissen eine proleolytische Aktivität erst im Duodenum auftreten kann.

Außerdem konnten verschiedene Arbeitskreise experimentell nachweisen, daß auch aktivierte proteolytische Enzyme das gesunde Pankreas nicht schädigen können (1,4,5).

Erst wenn Zellschädigung und Proteolyse zusammentreffen, kann eine Pankreasnekrose entstehen (6).

Aus diesen Überlegungen kann man schließen, daß nicht, wie bis vor kurzer Zeit angenommen, das Trypsin die Hauptursache für die Entstehung der Pankreatitis darstellt, sondern daß mehrere Enzyme mehr oder weniger daran beteiligt sind.

Nach neueren Untersuchungen sind für die Pathogenese der akuten Pankreatitis vorwiegend die Pankreaslipase, die Phospholipase A und die Elastase verantwortlich.

Es wurde nachgewiesen, daß durch Instillation von Lipase in das Pankreasgangsystem in Gegenwart aktivierender Gallensäure typische Fettgewbsnekrosen hervorgerufen werden können (7,8).

Ebenso können durch Lysolecithine, die Folgeprodukte der enzymatischen Wirkung von Phospholipase A, Pankreasnekrosen erzeugt werden (5,9,10,11). Die Lysoverbindungen Lysolecithin und Lysokephalin besitzen eine starke Cytotoxizität und hämolysierende Wirkung. Deshalb ist auch durch eine Lysophospholipase das Dünndarmepithel gegen diesen cytotoxischen Effekt geschützt.

Durch Injektion von Phospholipase A allein ins Pankreas einer Ratte ist es nicht möglich, Nekrosen zu erzeugen. Es ist also die Gegenwart von Galle oder gallesäurehaltigem Duodenalinhalt, dessen wesentli-

cher Bestandteil Lecithin ist, notwendig, um Pankreasnekrosen entstehen zu lassen.

Von den Peptidasen ist noch die Elastase zu erwähnen, der bei der Pathogenese der Pankreatitis Bedeutung zukommt. Sie greift die elastischen Fasern der Gefäße an, löst sie auf und verursacht dadurch Blutungen (12).

II. Enzyminhibitoren

Die im menschlichen Körper vor sich gehenden Lebensvorgänge sind zum größten Teil chemische Reaktionen. Die Vielzahl von nebeneinander ablaufenden Prozessen muß geregelt und gesteuert werden, wenn ein koordinierter Ablauf des Lebens möglich sein soll. Diese Koordinierung erfolgt durch Enzyme, welche man als Regulatoren des chemischen Geschehens im Körper bezeichnen kann, indem die Reaktionen auf die notwendige Geschwindigkeit beschleunigt werden. Durch Inhibitoren erfolgt eine Verringerung der Enzymaktivitäten, wodurch eine Bremsung der Reaktionen erfolgt. Hierdurch wird eine komplette Steuerung der chemischen Lebensvorgänge ermöglicht (13).

Am besten wurden bisher die Wirkungsmechanismen bei der Inhibierung hydrolytischer Enzyme durch spezifische natürliche Inhibitoren am Beispiel der Proteaseninhibitoren untersucht, seit im Jahre 1929 Kraut, Frey und Werle in Lymphknoten, Parotis, Milz und Leber des Rindes einen Hemmstoff für Kallekrein beschrieben (27-31).

Viele Arbeitsgruppen versuchen inzwischen Inhibitoren verschiedenster Herkunft rein darzustellen, chemisch zu charakterisieren, den Reaktionsmechanismus der Inhibitoren mit den entsprechenden Enzymen zu studieren und sowohl in vitro wie in vivo ihre physiologischen Funktionen aufzuklären (32-40).

Allgemein läßt sich die Aufgabe der in der Natur vorkommenden Inhibitoren darin sehen, biologisch wichtige Proteinlösungen und Gewebe vor körpereigenen und fremden proteolytischen, esterolytischen und evtl. kininliberierenden Enzymen zu schützen. Dabei regeln und kontrollieren die Inhibitoren die katalytische Aktivität der Enzyme (1).

An der Bindung eines Enzym-Substrat-Komplexes ist aber nicht das ganze Enzym, sondern nur ein räumlich begrenzter, kleiner Bezirk des Enzymproteins beteiligt. Diesen bezeichnet man als aktives Zentrum des Enzyms (14).

In der Wirkungsweise der Inhibitoren lassen sich verschiedene Typen beobachten:

Kompetetive Hemmung

Der Inhibitor und das Substrat konkurrieren um das aktive Zentrum des Enzyms, worauf eine Hemmung der Aktivität resultiert. Zur Erreichung der maximalen Geschwindigkeit ist eine höhere Substratkonzentration notwendig. Das relative Ausmaß der Hemmung wird durch das Konzentrationsverhältnis Inhibitor/Substrat bestimmt.

Nichtkompetetive Hemmung

Der Inhibitor lagert sich außerhalb des aktiven Zentrums an das Enzym, wodurch die Aktivität herabgesetzt wird, ohne daß die Bindungsverhältnisse zwischen Enzym und Substrat beeinflußt werden. Die Substratkonzentration spielt für das relative Ausmaß der Hemmung keine Rolle.

Unkompetetive Hemmung

Der Inhibitor reagiert nur mit der Enzym-Substrat-Verbindung, so daß die maximale Geschwindigkeit als auch die Michaelis-Konstante in gleichem Maße herabgesetzt wird.

Hemmung durch Substratüberschuß

Bei zu hoher Substratkonzentration kann es zur Bildung eines inaktiven oder weniger aktiven Enzym-Substrat-Komplexes kommen, wobei der Hemmeffekt um so größer wird, je größer der Substratüberschuß ist (15).

III. Die Pankreaslipase, eine Carboxylester-Hydrolase

Die Carbonsäure-Esterasen kann man in zwei Gruppen nach dem Grade ihrer Spezifität einteilen. Lipasen und Esterasen in engerem Sinne (Aliesterasen) faßt man unter dem Begriff "gruppenspezifische Carbonsäure-Esterasen" zusammen. Es handelt sich hierbei um Enzyme mit verhältnismäßig geringer Substratspezifität. Zur zweiten Gruppe, Carbonsäure-Esterasen

mit strengerer Substratspezifität, zählt man die Phospholipase, die Cholesterin-Esterase, die Chlrophyllase, die Pectinesterase und die Tannase. Im folgenden Abschnitt soll nur die erste Gruppe kurz erläutert werden.

Während man früher annahm, daß Lipasen bevorzugt Glycerinester langkettiger Fettsäuren und Esterasen in engerem Sinne die Fettsäureester einwertiger Alkohole hydrolisieren, erweist sich in letzter Zeit ein fließender Übergang der Grenzen.

Die Pankreaslipase, durch ihre Wirkung auf emulgierte wasserunlösliche Substrate, und die Lipoproteidlipase, durch ihre Bevorzugung von Lipoproteid als Substrat, lassen sich jedoch den anderen Lipasen und Esterasen gegenüber gut abgrenzen (18,21,22,41,42).

Die wichtigsten Vorkommen von gruppenspezifischen Carbonsäure-Esterasen in Sekreten, Exkreten und Geweben sind: Blutserum, Milch, Harn, Magen, Leber, Dünndarmschleimhaut und Pankreas (1,16,43).

Der Großteil der Gesamtnahrungslipide ist ein Gemisch zahlreicher Triglyceride. Diese werden durch die Magenlipase unvollständig hydrolisiert, d.h. die Lipide werden verflüssigt und gehen in die sog. "Ölphase" über. Dadurch ist eine bessere Emulgierung durch die Gallensäuren und ein Abbau durch die Pankreaslipase möglich, welche Triglyceride zu Fettsäuren und β -Monoglyceriden abbaut, da sie hauptsächlich die in α - bzw. α' -Position stehenden Fettsäuren abspaltet. Nachdem die Fettsäuren resorbiert worden sind, erfolgt in der Mucosazelle die Resynthese zu Triglyceriden.

Diese werden mit Phospholipiden, Cholesterin und Cholesterinester über das Lymphgefäßsystem abtransportiert. Kurzkettige Fettsäuren (bis zu 10-C-Atomen) können in freier Form über die V. portae der Leber zugeführt werden.

Die Pankreaslipase wird in den Acinuszellen des exokrinen Pankreas gebildet. Das wasserlösliche Protein mit dem Molekulargewicht von 48000 soll aus einer Peptidkette bestehen, die 4 Methionin-Moleküle, 7 Tryptophan-, 10 Histidin-Moleküle sowie 6 Disulfidbrücken und 2 freie SH-Gruppen besitzt (17).

Die Pankreaslipase spaltet Triglyceride, Diglyceride und Monoglyceride. Aber auch Ester einfacher Alkohole, sofern sie in Emulsionen vorliegen, werden hydrolysiert. Ca^{++} und Mg^{++} erhöhen die Aktivität des Enzyms, wobei sich Ca^{++} an das Enzym anlagert. Verschiedene Gallensalze, Albumin und andere oberflächenaktive Substanzen zeigen einen deutlich aktivierenden Effekt (17,18,44,45).

Gegen organische Phosphoverbindungen ist die Pankreaslipase verhältnismäßig wenig empfindlich. Diisopropylfluorophosphat zeigt sogar eine stabilisierende Wirkung, allerdings wirkt Diäthyl-p-nitrophenylphosphat hemmend. Ebenso ist Chinin ein wichtiger Inhibitor. Wie aus Arbeiten von Desnuelle (19,20) hervorgeht, entfaltet die Pankreaslipase ihre Wirkung ausschließlich gegenüber unlöslichen, in Emulsion vorliegenden Substraten, während gelöste Substrate kaum oder überhaupt nicht angegriffen werden.

Experimenteller Teil

C) ERGEBNISSE

1. Der Lipidrohextrakt aus Ricinus zeigt eine Hemmung der Lipaseaktivität von 64 %.
2. Durch dünnsschichtchromatographische Vorversuche des Lipidgemisches mit 17 verschiedenen Fließmitteln ergibt sich die exakteste Auftrennung mit Petroleumbenzin (Kp 40-60)/Äthylmethylketon/Eisessig (84:15:1).
3. Mit diesem Fließmittel wird der Ricinusextrakt durch Säulenchromatographie in 8 Fraktionen getrennt, wovon Fraktion VIII die größte antilipolytische Wirkung besitzt.
4. Chloroform/Eisessig (96:4) erweist sich als Fließmittel mit dem größten trennenden Effekt von Fraktion VIII nach dünnsschichtchromatographischer Rechromatographie.
5. Durch Säulenchromatographie erhält man 3 Fraktionen. Die Fraktion mit der größten Antilipasewirkung besteht aus 2 Lipidkomponenten.
6. Nach Auskratzen der Komponenten ist es möglich, mit 25 mg Lipid eine Hemmwirkung von 40 % zu erzielen.
7. Eine weitere Auftrennung kann mit der DC-Methode nicht erreicht werden. Dies stellt jedoch kein Beweis der Einheitlichkeit dar.
8. Der Phospholipidnachweis verläuft negativ. Mit Ninhydrin-Reagenz, Dragendorff-Reagenz und Ammoniummolybdat-Perchlorsäure-Lösung kann kein Phospholipid nachgewiesen werden.
9. Nach alkalischer Hydrolyse führt weder der verseifbare noch der unverseifbare Anteil der Lipidkomponente zu einer Verminderung der Lipaseaktivität.

D) MATERIAL

1. Enzym: Lipase aus Schweinepankreas (Serva)
2. Substrat: Oleum olivae neutralisatum sterilisatum, Ph. H.V. (Siegfried)
3. Reagenzien: Aceton p.A. (Merck)
Äthylmethyleketon p.A. (Merck)
Benzol p.A. (Merck)
Chloroform p.A. (Merck)
Diäthyläther p.A. (Merck)
Diisobutylketon p.A. (Merck)
Essigsäure p.A. (Merck)
Methanol p.A. (Merck)
Petroleumbenzin (Kp 30-50) (Riedel)
Petroleumbenzin (Kp 40-60) (Merck)
Petroleumbenzin (Kp 50-70) (Riedel)
Petroleumbenzin (Kp 60-80) (Merck)
4. Material für Chromatographie:
DC-Alufolien, Kieselgel 60 F 254,
20 x 20 cm, Schichtdicke 0,25 mm
(Merck)
Kieselgel G 60, Korngröße 0,063-
0,200 μ m (Merck)
2',7' Dichlorfluorescein Sprüh-
reagenz 0,1 % (Merck)
Ninhydrin Sprühreagenz (Merck)
5. Geräte: Magnetrührer
Fraktionssammler
Ultra-Turrax
Autotitrator (Metrohm)
5 x 110cm-Säule mit Glasfritte,
Teflonhahn und Olive
Erlenmeyerkolben
Eindampfkolben
Pipetten

E) METHODIK

I. Herstellung der Gebrauchslösungen

1. Lipaselösung

10 mg Lipase aus Schweinepankreas werden in 10 ml aqua bidest. mit Hilfe eines Magnetrührwerks (2 min.) gelöst (1 Tag haltbar).

2.a) Wahl des Substrats:

Berücksichtigt man die Angaben von Desnuelle und Savary (21) zur Spezifität des Enzyms, so sind alle wasserlöslichen Substanzen als Substrate ungeeignet. Unter den wasserunlöslichen ist vor allem Olivenöl von zahlreichen Autoren benutzt worden (22).

Zur Bestimmung der Aktivität der lipolytischen Enzyme eignet sich ein kinetischer Test mit einer Emulsion von Olivenöl in Gummi arabicum-Lösung als Substrat.

b) Gummi arabicum-Lösung

50 g Gummi arabicum werden mit 500 ml aqua bidest. 15 min. im Star-Mix gemischt, bis die Substanz vollständig gelöst ist (kühl aufbewahrt ca. 4 Wochen haltbar).

c) Olivenölemulsion

80 ml einer 10%-igen Gummi arabicum-Lösung und 20 ml Olivenöl (Verhältnis 4:1) werden 5 min. im

Star-Mix homogenisiert, anschließend auf pH 10 gebracht, wiederum homogenisiert und auf pH 8,6 eingestellt (kühl aufbewahrt etwa 1 Woche haltbar).

II. Kinetischer Test zur Bestimmung der Enzymaktivität

Prinzip:

Die durch die lipolytischen Enzyme aus einer Olivenölemulsion bei 25°C unter optimalen Bedingungen freigesetzten Fettsäuren werden bei pH 8,6 kontinuierlich mit Alkali (Natronlauge 0,1 n) titriert. Dadurch wird das für die enzymatische Reaktion optimale pH konstant gehalten, so daß keine Puffersubstanzen zugesetzt werden müssen. Das pH des Inkubationsansatzes wird mit einer Glaselektrode gemessen; als Bezugselektrode dient eine gesättigte Kalomelelektrode. Die Zugabe des Alkali wird durch einen Titrator gesteuert und registriert.

Gummi arabicum als inertes Polysaccharid dient zur Erzielung einer stabilen Olivenölemulsion (22).

Durchführung:

Ansatz:	Im Becherglas werden auf 25°C
(= Leerwertansatz)	temperiert:
	10 ml Olivenölemulsion,
	1 mg Lipase in 2 ml aqua bidest.
	gelöst,
	10 ml Gummi arabicum-Lösung.

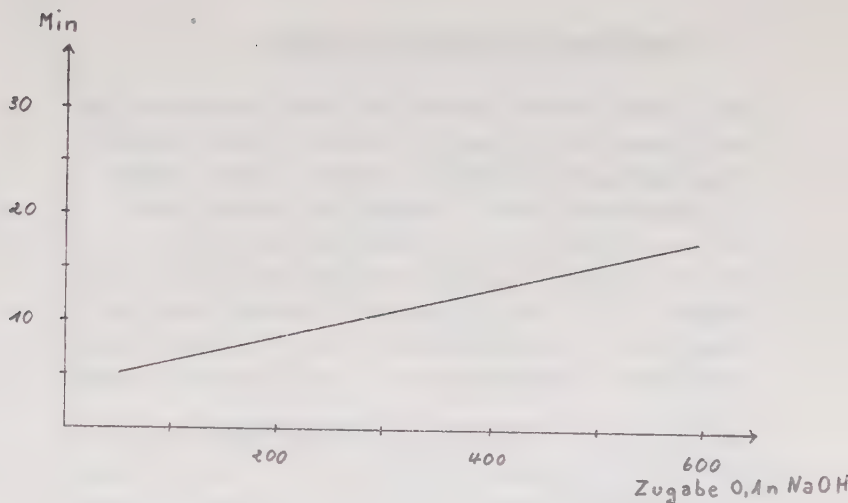


Abb. 1: Titration der freigesetzten Fettsäuren

Bei obenstehendem Ansatz ergibt sich - wie aus Abb. 1 zu ersehen ist - eine Lipaseaktivität von 45 μ l verbrauchter 0,1 n Natronlauge.

Bei Konstanthaltung des pH 8,6 und einer Temperatur von 25°C erhält man eine geradlinige Steigerung über mindestens 20 min., d.h. eine gleichmäßige Zugabe von NaOH während dieser Zeit.

III. Gewinnung des Lipidrohextrakts

100 g Ricinus-Samen werden mit einer Handmühle gemahlen und mit 1 l Aceton versetzt. Nach fünfstündigem intensiven Rühren wird der Lipidrohextrakt in einer Fritte unter Vakuumstrahl abgefiltert. Um einen acetonfreien Lipidextrakt zu erhalten, wird das Aceton im Vakuumrotationsverdampfer abgedampft. Die so erhaltenen Lipide werden anschließend in 90 ml Petroleumbenzin (Kp 40-60) und 10 ml Diäthyläther konserviert für weitere Untersuchungen.

Zur Untersuchung des Ricinuslipidextrakts auf antilipolytische Wirkung werden 20 ml der in Petroleumbenzin/Diäthyläther (9:1) gelösten Lipide entnommen und im 100-ml-Eindampfkolben mittels Vakuumrotationsverdampfers vom Lösungsmittel befreit.

Um eine Emulsion herzustellen, gibt man zu den lösungsmittelfreien Lipiden 20 ml einer 10%-igen Gummi-arabicum-Lösung. Dies wird 2 min. im Ultra-Turrax homogenisiert.

IV. Bestimmung der inhibitorischen Wirkung des Gesamtlipidextrakts aus Ricinus

1. Lipaseaktivität: 45 μ l/min. verbrauchter
0,1 n NaOH (s. S. 13)
2. Ansatz: 10 ml Ricinus-Lipid-Emulsion,
(= Lipid-Rohextrakt- 1 mg Lipase in 2 ml aqua bidest.
Hemmansatz) gelöst
10 ml Olivenöl-Emulsion

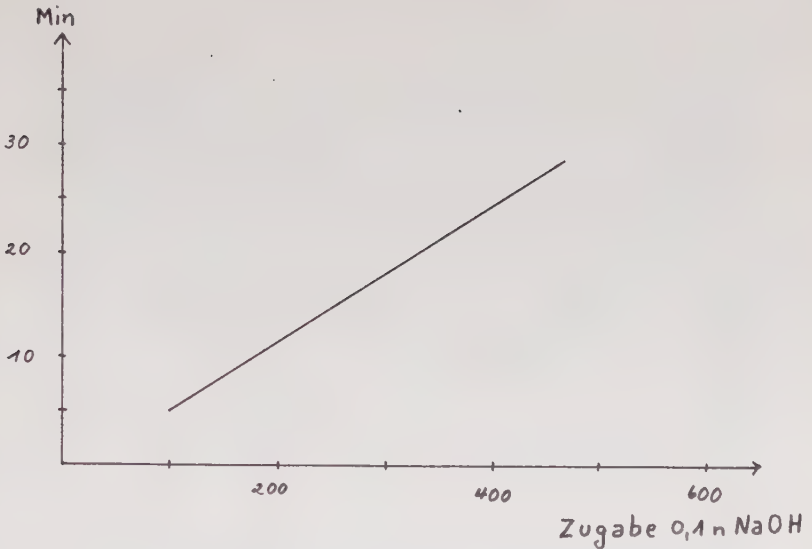


Abb. 2: Titration der freigesetzten Fettsäuren nach Zugabe von Hemmstoff

Lipaseaktivität nach Zugabe von Ricinus-Lipidextrakt: 16 μ l/min. verbrauchter 0,1 n NaOH.

Durch Ricinus-Lipidextrakt erzielte Hemmwirkung in %:

$$\begin{aligned} &= 100 - 100 \times \frac{16}{45} \\ &= 64,4 \% \end{aligned}$$

Antilipasewirkung wird ebenfalls bei den Gesamtlipidextrakten der nachfolgenden Pflanzensamen gefunden:

Erdnuß (68 % Hemmung), Mohn (70 % Hemmung),
Raps (50 % Hemmung), Soja (60 % Hemmung).

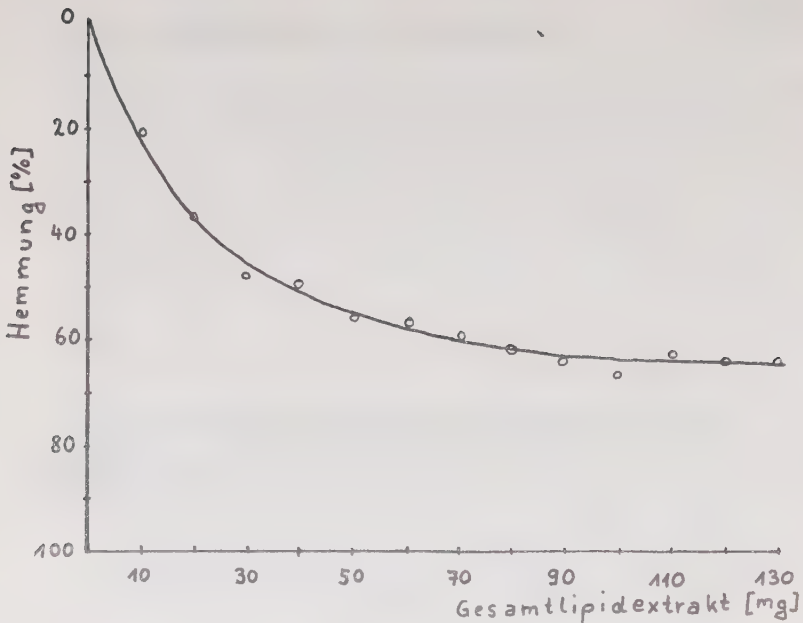


Abb. 3: Hemmkurve: Hemmung der Lipaseaktivität durch Lipide des Gesamtlipidextraktes aus Ricinus.

Diskussion:

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem Ausmaß der Hemmung der Lipaseaktivität und der Konzentration des Lipidinhibitors wird eine definierte Menge vorgelegt und verschiedene Lipidmengen zugegeben. Die bei der Titration verbrauchte Natronlauge ist ein Maß für die verbleibende Enzymaktivität.

Die Enzymhemmung ist eine Sofortreaktion. Unmittelbar nach Zusammentreffen der Reaktionspartner ist eine Inhibierung nachweisbar, die auch bei längerer Inkubationszeit konstant bleibt. Es kommt dabei zu

keinem Abbau des Hemmstoffs, so daß man von permanenter Hemmwirkung sprechen kann.

Bei einer Hemmung von 64,4 % ist die Endhemmung erreicht, das heißt auch bei steigender Lipidkonzentration im Inkubationsansatz ist eine größere Inhibierung der Lipaseaktivität nicht möglich. Dies kann an dem Lipasepräparat liegen, das außerdem noch unspezifische Esterasen enthält.

V. Versuche zur Isolierung des Hemmstoffes

1. Dünnschichtchromatographie zur Ermittlung eines geeigneten Elutionsmittels

Theoretische Grundlagen

1938 wurde das Prinzip der Dünnschichtchromatographie erstmals von den russischen Forschern Ismailov und Shraiber unter dem Titel "Tropfenchromatographische Analysenmethode und Anwendung in der Pharmazie" beschrieben. Die Methode fand jedoch kaum Verwendung bis Stahl 1958 die großen Gebrauchsmöglichkeiten des Verfahrens aufzeigte. Heute hat die Dünnschichtchromatographie wegen ihrer Trennschärfe, Empfindlichkeit und Schnelligkeit die papierchromatographische Methode weitgehend abgelöst (23).

Adsorptions- oder Tswettchromatographie

Hierbei handelt es sich um physikalische Oberflächenkräfte, wobei es zur reversiblen Bindung der wandernden Verbindungen an der Oberfläche des Adsorbens kommt (24).

Verteilungschromatographie

Die Verteilung der zu trennenden Substanzen erfolgt zwischen zwei flüssigen Phasen; die stationäre Phase, über die das Laufmittel wandert und die mobile Phase. Die sich einstellenden Verteilungsgleichgewichte und damit die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Stoffe wird durch den Nernst'schen Verteilungssatz bestimmt (25).

Wir gebrauchen das von Stahl 1958 standardisierte Verfahren der Dünnschichtchromatographie für Vorversuche der säulenchromatographischen Analyse um ein geeignetes Elutionsmittel zu finden.

Die Herstellung der Platten kann durch Aufstreichen, Aufgießen, Eintauchen oder Aufsprühen eines geeigneten Sorptionsmittels auf eine Trägerscheibe aus Glas oder Aluminiumfolie erfolgen.

Durchführung:

Wir arbeiten mit im Handel befindlichen vorgefertigten Platten der Fa. Merck. Die Trägerscheibe besteht aus Aluminium, das Sorptionsmittel aus Kieselgel.

Auf die quadratischen DC-Platten (20 x 20 cm) werden 1,5 cm vom unteren Rand die Startpunkte in einem Abstand von 2 cm mit Bleistift eingezeichnet. Die Laufstrecke beträgt 14 cm und wird mit Bleistift markiert.

Auftragen des zu trennenden Lipidgemisches auf DC-Alufohlen

Das gesamte Lipidgemisch aus Ricinus liegt als Lösung in Petroleumbenzin und Diäthyläther vor. Mit Hilfe eines dünnen Kapillarröhrchens werden 5 Tropfen

auf die Startpunkte der DC-Platten aufgebracht. Nach jedem Auftragen eines Tropfens wird mit einem Föhn getrocknet, um die Substanz auf engstem Raum zusammenzuhalten und damit den besten Trenneffekt zu erzielen.

Wahl des Fließmittels

Als Fließmittel werden die von Stahl empfohlenen verwendet. Mischungen von Petroläther und 10 bis 50 % Diäthyläther eignen sich zur Fraktionierung von Alkoholen und Aldehyden, Mono-, Di- und Tri-glyceriden (24). Um eine Streifen- und Schwanzbildung durch freie Fettsäuren zu verhindern, erfolgt ein Zusatz von 1 bis 2 % Eisessig.

Entwicklung der Dünnschichtchromatogramme:

Zur Entwicklung der DC-Platten stehen uns rechteckige Trogkammern (21x21x9cm) mit breitem Wulstrand und Ganzglasdeckel zur Verfügung. Nach gründlicher Reinigung und Trocknung der Kammern wird das Lösungsmittel eingefüllt, so daß es etwa 1 cm hoch den Kammerboden bedeckt. Um ein "Randphänomen", d.h. unterschiedlicher Rf-Wert einer Substanz auf ein und derselben DC-Platte auszuschließen, muß eine gleichmäßige Sättigung der Kammern mit den Fließmitteldämpfen vor der Chromatographie erreicht werden. Dies geschieht, indem man ein Filterpapier (15x40cm) u-förmig in den Glastrog einlegt und mit Fließmittel tränkt. Das Papier haftet adhäsiv an der Kammerwand. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die geringere Laufzeit.

Ist die gewünschte Laufstrecke des Fließmittels von 15,5 cm erreicht, wird die DC-Platte aus der Kammer herausgenommen, getrocknet und ausgewertet.

Nachweismethoden

Zum Nachweis von Lipiden auf DC-Platten sind verschiedene Reagenzien geeignet, die auch bei der papierchromatographischen Auftrennung von Lipiden Verwendung finden. Die gebräuchlichsten davon sind:

1. Jod färbt alle ungesättigten und einige stickstoffhaltige Lipide auf hellem Grund tiefbraun, wobei weniger als 1 g einer ungesättigten Lipidverbindung nachzuweisen ist.
2. Im UV-Licht als blauviolette Flecken auf rotem Grund sind Lipide zu erkennen, die mit einer 0,25%-igen Lösung von Rhodamin B in 96%-igem Äthanol nachgewiesen werden.
3. Mit Chromschwefelsäure erreicht man über einer elektrischen Heizplatte eine Veraschung von Lipiden, die als dunkle Flecken zu erkennen sind.
4. Durch Besprühen der Chromatogramme mit einer 0,1%-igen äthanolischen 2',7'-Dichlorfluoresceinlösung ist es möglich nahezu alle Lipide als hellgrüne fluoreszierende Flecken im UV-Licht sichtbar zu machen.

Die Lipide aus Ricinus werden mit der unter 4 beschriebenen Methode nachgewiesen.

Ergebnisse

Zur Erzielung einer exakten Trennung des Lipidge-samtexttrakts im sich anschließenden säulenchromatographischen Verfahren werden dünn-schichtchromatographische Vorversuche mit 17 verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt.

Abb. 4.1.

$R_f = 1$



Petroleumbenzin (Kp 40-60)/Diäthyläther/Eisessig 85:15:1



Petroleumbenzin (Kp 30-50)/Diäthyläther/Eisessig 90:10:1



Petroleumbenzin (Kp 50-70)/Diäthyläther/Eisessig 90:10:10



Petroleumbenzin (Kp 50-70)/Diäthyläther/Eisessig 75:25:1



Petroleumbenzin (Kp 60-80)/Diäthyläther/Eisessig 90:10:1



Petroleumbenzin (Kp 40-60)/Diäthyläther/Eisessig 75:25:1



Petroleumbenzin (Kp 40-60)/Diäthyläther/Eisessig 90:10:1

Abb. 4.2.

Rf = 1



Petroleumbenzin (Kp 60-80)/Diäthyläther/Eisessig 80:20:1



Petroleumbenzin (Kp 40-60)/Diäthyläther/Eisessig 80:20:1



Petroleumbenzin (Kp 40-60)/Diäthyläther/Eisessig 70:30:1



Petroleumbenzin (Kp 40-60)/Äthylmethylketon/Eisessig 95:14:1



Petroleumbenzin (Kp 40-60)/Äthylmethylketon/Eisessig 84:15:1

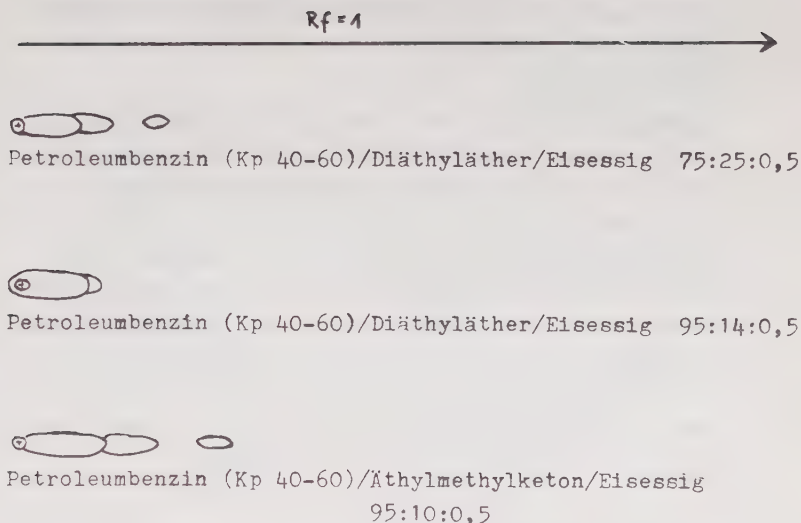


Petroleumbenzin (Kp 60-80)/Diäthyläther/Eisessig 70:30:0,5



Petroleumbenzin (Kp 50-70)/Diisobutylketon/Eisessig 87:15:0,7

Abb. 4.3.



ad Abb. 4.1., 4.2., 4.3.:

Ermittlung des optimal wirkenden Trennmittels für den Ricinuslipidrohextrakt.

Aus der Abbildung ist ersichtlich, daß die exakteste Auftrennung des Lipidgemisches mit dem Fließmittel Petroleumbenzin (Kp 40-60)/Äthylmethylketon/Eisessig (84:15:1) erfolgt. Daher wird dieses Laufmittel auch als Elutionsmittel zur säulenchromatographischen Analyse verwendet.

2. Säulenchromatographie

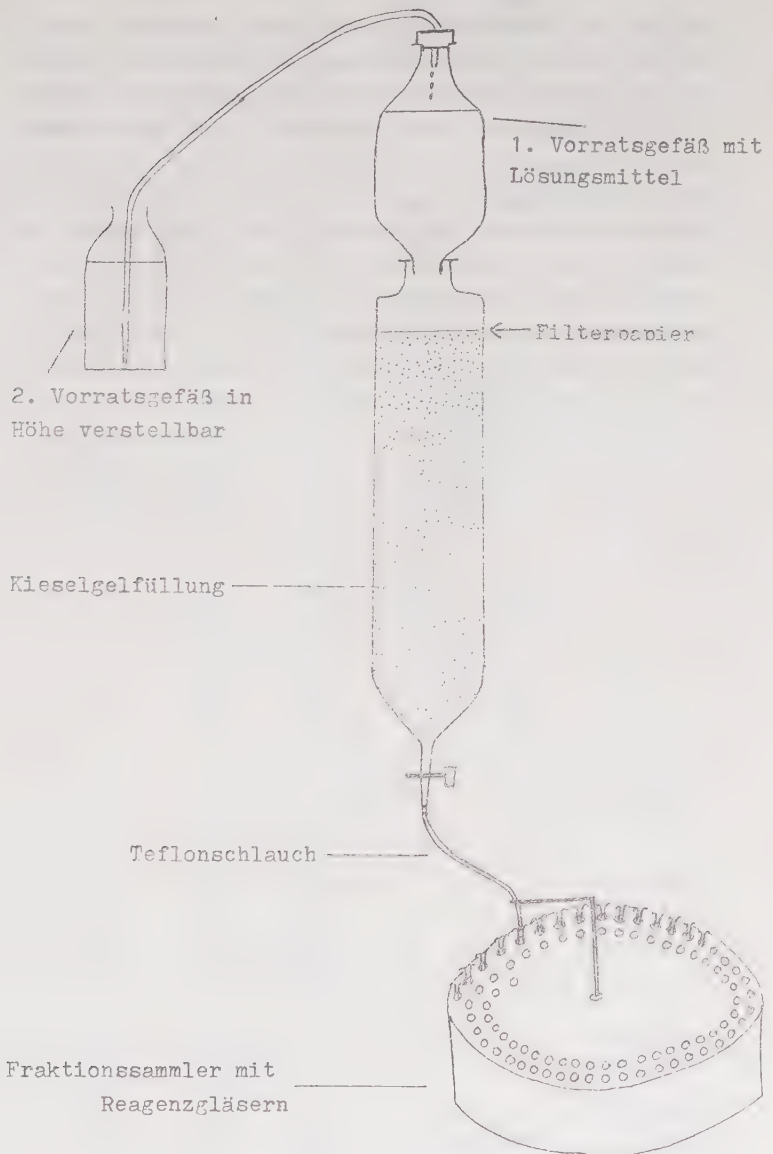
Nachdem das optimal trennende Fließmittel ermittelt worden ist, wird eine säulenchromatographische Auftrennung des Gesamtlipidextraktes aus Ricinus durchgeführt.

Kieselgel wird mit dem Lösungsmittelgemisch aus Petroleumbenzin (Kp 40-60)/Äthylmethylketon/Eisessig (84:15:1) in einem großen Erlenmeyerkolben äquiliбриert und in eine Glassäule (5x110cm) eingefüllt. Die Säule wird mit einer Glasplatte abgedeckt und bleibt über Nacht stehen, damit die Füllung kompakt wird. Dabei ist darauf zu achten, daß genügend Lösungsmittel über dem oberen Kieselgelrand steht, um ein Trockenwerden zu verhindern. Bevor die zu trennende Substanz aufgetragen wird, wird die Säule mit 2 bis 3 l des Fließmittels durchgespült.

Auftragen des Lipidextraktes

Nach Auswaschen der Säule mit Petroleumbenzin (40-60)/Äthylmethylketon/Eisessig werden 30g des Gesamtlipidextraktes, gelöst in 50 ml des Elutionsmittels auf die Säule aufgetragen. Auf ein rundes Filterpapier, das die Kieselgeloberfläche bedeckt, wird die Lipidlösung bei geschlossenem Auslaufhahn mit einer Pipette aufgebracht, sodann der Hahn kurzzeitig geöffnet bis der Lipidextrakt eingesickert ist. Anschließend spült man das Aufbewahrungsgefäß des Lipids, die Pipette und die Säulenwandung oberhalb der Kieselgelfüllung mit Petroleumbenzin/Äthylmethylketon/Eisessig (84:15:1) nach, wobei wiederum das Lösungsmittel abgelassen wird. Dann wird ein Vorratsbehälter der Säule aufgesetzt und Elutionsmittel zugelassen.

Abb. 5: säulenchromatographische Anordnung



Eluierung der Komponenten

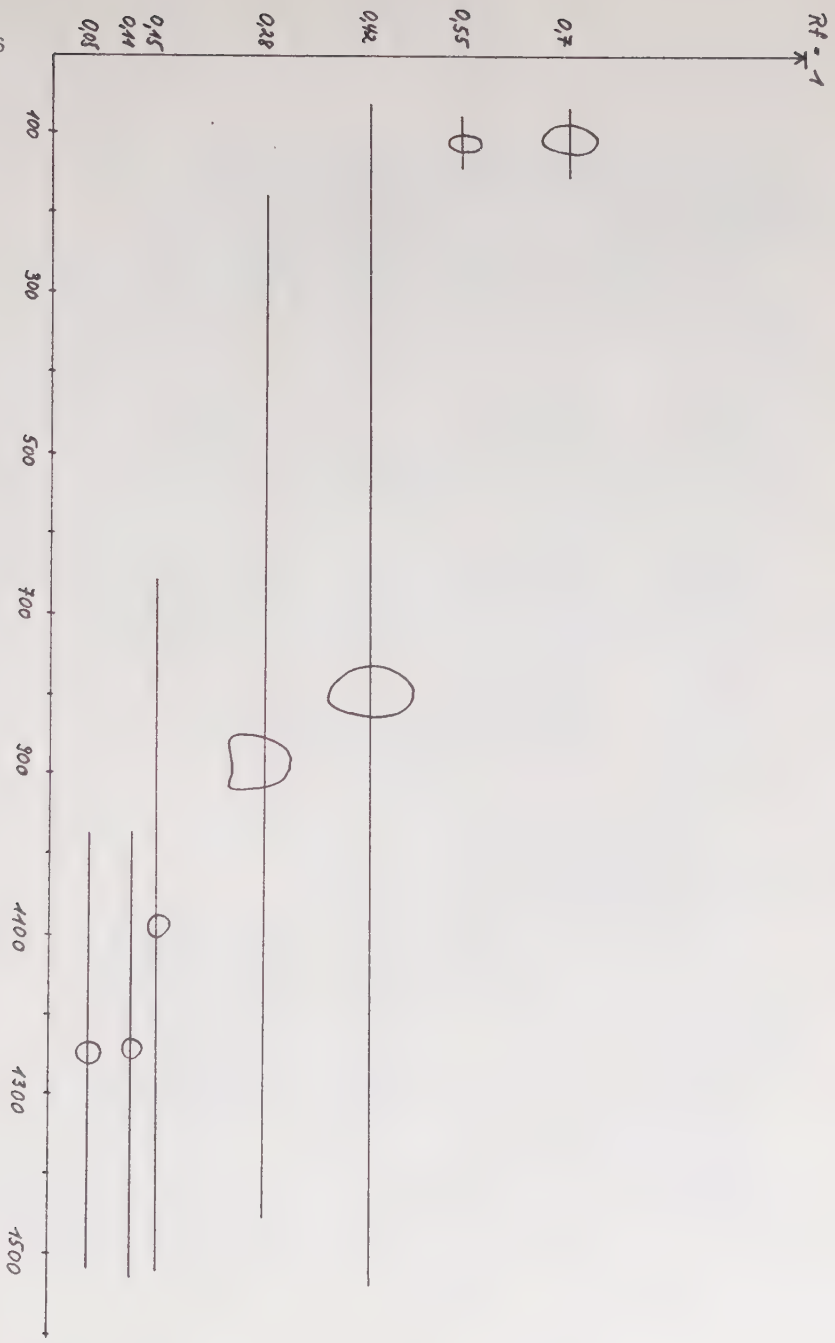
Nachdem der Auslaufhahn vollständig geöffnet worden ist, wird eine konstante Tropfgeschwindigkeit durch Höhenregulierung des zweiten Vorratsgefäßes erreicht. Das Auffangen des Eluats geschieht in Reagenzgläsern zu 10 ml-Mengen.

Die qualitative Analyse wird durch fortlaufende Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Dazu werden aus jeder 3. Fraktion jeweils 5 Tropfen auf DC-Platten aufgetragen und im gleichen Lösungsmittel, mit dem sie eluiert wurden, entwickelt. Der Nachweis lipidhaltiger Fraktionen erfolgt durch Sichtbarmachung mit 2',7'Dichlorfluoreszein im UV-Licht.

Elutions-Nr.	Fraktions-Nr.	Rf-Wert	Hemmung in %
1- 48	—	—	—
49- 56	I	0,7	—
57- 117	II	0,7 + 0,55 + 0,42	45
118- 157	III	0,42	15
158- 645	IV	0,42+ 0,28	43
646- 933	V	0,42+ 0,28 + 0,15	10
934- 985	VI	0,42+ 0,28 + 0,15	8
986-1461	VII	0,42+ 0,28 + 0,15+ 0,11 + 0,05	12
1462-1521	VIII	0,15+ 0,11 + 0,05	48
1522-1685	—	—	—

Tab. 1: Säulenchromatographische Auftrennung

Abb. 6



Zu Abb. 6:

Vorfractionierung der Lipide an Kieselgel.

Eingezeichnet sind die Dünnschichtchromatogramme aller von der Säule eluierten Fraktionen. Fraktionsbereiche mit entsprechenden Substanzen sind durch Striche gekennzeichnet.

Aus Tab. 1 ist ersichtlich, daß der Lipasehemmstoff in nahezu allen Fraktionen mehr oder weniger enthalten ist. Da jedoch die Fraktion VIII die größte antilipolytische Wirkung zu verzeichnen hat, wird diese zur weiteren Untersuchung verwendet. Die Fraktion besteht nicht aus einem einheitlichen Produkt, sondern setzt sich aus 3 verschiedenen Komponenten mit den RF-Werten 0,15, 0,11 und 0,05 zusammen.

Die hemmstoffhaltige Fraktion VIII stellt 1 % (= 300 mg) der aufgetragenen Lipidmenge dar.

Fließmittelsuche für Fraktion VIII

Zur Ermittlung des optimal wirkenden Trennmittels für Fraktion VIII werden dünnschichtchromatographische Versuche mit 28 verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt.

Bei den in der nachstehenden Tabelle aufgeführten Fließmitteln bleibt das Lipidgemisch auf den Startpunkten zurück.

Tab. 2: Fließmittelsuche für Fraktion VIII

Fließmittel	Mischungsverhältnis
Petroleumbenzin(Kp40-60)/Äthylmethylketon/Eisessig	95:10:0,5
Petroleumbenzin(Kp40-60)/Diäthyläther/Eisessig	85:15:1
Petroleumbenzin(Kp30-50)/Diäthyläther/Eisessig	90:10:1
Petroleumbenzin(Kp50-70)/Diäthyläther/Eisessig	90:10:1
Petroleumbenzin(Kp60-80)/Diäthyläther/Eisessig	90:10:1
Petroleumbenzin(Kp40-60)/Diäthyläther/Eisessig	75:25:1
Petroleumbenzin(Kp40-60)/Diäthyläther/Eisessig	90:10:1
Petroleumbenzin(Kp60-80)/Diäthyläther/Eisessig	90:10:1
Petroleumbenzin(Kp40-60)/Diäthyläther/Eisessig	80:20:1
Petroleumbenzin(Kp40-60)/Diäthyläther/Eisessig	70:30:1
Petroleumbenzin(Kp60-80)/Diäthyläther/Eisessig	70:30:1
Petroleumbenzin(Kp40-60)/Diäthyläther/Eisessig	75:25:0,5
Petroleumbenzin(Kp40-60)/Diäthyläther/Eisessig	85:15:0,5
Petroleumbenzin(Kp40-60)/Äthylmethylketon/Eisessig	95:10:1
Petroleumbenzin(Kp50-70)/Äthylmethylketon/Eisessig	87:13:0,5
Chloroform/Methanol/H ₂ O	65:25:4
Chloroform/Methanol/H ₂ O	70:30:0,5
Chloroform/Methanol/Eisessig/H ₂ O	65:25:8:4
Petroleumbenzin(Kp50-70)/Benzol	95:5
Methanol/Eisessig	95:5
Diäthyläther/Eisessig	95:5

$R_f = 1$

⊙ ⊙

Petroleumbenzin(Kp 50-70)/Diäthyläther/Eisessig 75:25:1

⊕ ⊙

Petroleumbenzin(Kp 40-60)/Äthylmethylketon/Eisessig 84:15:1

+ ⊙ ⊙
Chloroform/Methanol 95:5

+ ⊙
Äthylmethylketon

+ ⊙ ⊙
n-Propanol/12,5 %iger wässriger Ammoniak 80:20

+ ⊙
n-Propanol/H₂O 70:30

+ ⊙ ⊙ ⊙
Chloroform/Eisessig 96:4

Abb. 7: Ermittlung des optimal wirkenden Trennmittels für Fraktion VIII.

Chloroform/Eisessig (96:4) erweist sich als Fließmittel mit dem größten trennenden Effekt.

Säulenchromatographische Analyse der Fraktion VIII

200 mg Lipidextrakt der Fraktion VIII wird wie oben beschrieben auf eine Kieselgelsäule aufgebracht, die mit Chloroform/Eisessig(96:4) äquibriert ist. Die Lipide werden durch Dünnschichtchromatographie von jedem dritten Reagenzglas des Eluats nachgewiesen.

Elutions-Nr.	Fraktions-Nr.	Rf-Wert	Hemmung in %
1 - 41	—	—	—
42 - 63	I	0,57	—
64 - 80	II	0,57+0,48	50
81 - 120	III	0,48+0,4	20
121 - 200	—	—	—

Tab. 3: Säulenchromatographische Auftrennung von Fraktion VIII

Diskussion

Es handelt sich bei den hemmstoffhaltigen Fraktionen nicht um ein einheitliches Produkt, sondern um ein Lipidgemisch aus zwei Komponenten. Fraktion I zeigt keinerlei antilipolytische Wirkung. Da auch Fraktion III nur eine geringe Hemmwirkung von 20 % aufweist, und die gleiche Lipidkomponente wie Fraktion II beinhaltet, kann man daraus schließen, daß die Komponente mit dem Rf-Wert 0,48 die gesamte inhibitorische Leistung erbringt.

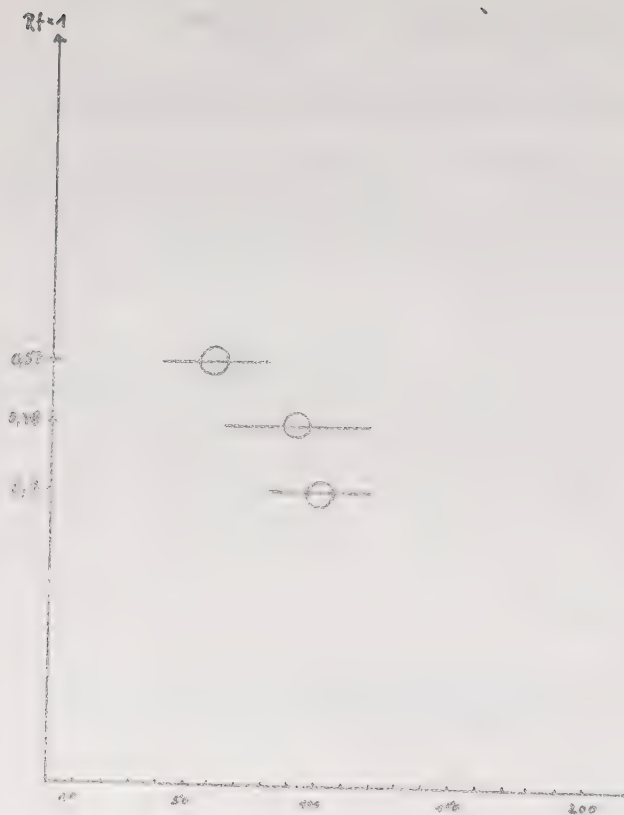
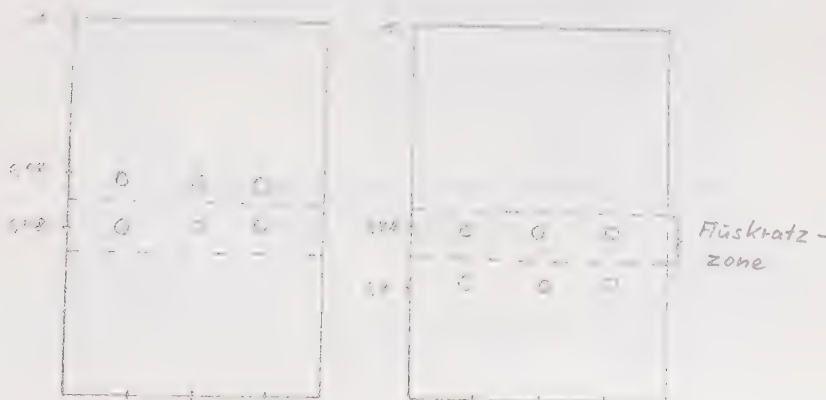


Abb. 8: Elutionsnummern der Säulenchromatographie.
Elutionsmittel: Chloroform/Eisessig 96:4
Fraktionierung der Lipide an Kieselgel
Fraktionsbereiche, in denen die entsprechenden Substanzen gefunden werden, sind durch Striche markiert.

Isolierung der Lipase-inhibitorisch wirksamen Komponente durch Auskratzen der einzelnen Lipidkomponenten auf den Dünnschichtchromatogrammen

Die Fraktionen I und III werden mit Kapillarrohren auf Glasfieselplatten aufgetragen und zur Entwicklung in eine mit Filterpapier ausgekleidete Kammer gegeben. Als Fließmittel dient Chloroform/Eisessig 96:4. Zur Lokalisation der Substanzflecken wird ein schmaler Streifen der DC-Platte mit 2',7' Dichlorfluorescein angefärbt, während der restliche Teil abgedeckt ist. Durch parallel zur Lösungsmittelfront gezogene Striche werden die Positionen der getrennten Substanzen festgelegt. Man kratzt die entsprechenden Bezirke mit einem Metallspatel aus und extrahiert die einzelnen Komponenten durch Überschütten des in einem Papierfilter befindlichen Kieselgels mit Chloroform/Eisessig. Nach Testung der Komponenten auf antilipolytische Wirkung ergibt sich, daß die Substanz mit dem Rf-Wert von 0,48 die Lipaseaktivität um 40 % zu hemmen vermag. Zum Test können jedoch nur noch 25 mg Lipid eingesetzt werden.

Abb. 9: Auskratzen der Lipidkomponenten



Diskussion

Das durch Auskratzung gewonnene Lipid stellt nur noch einen sehr geringen Teil, etwa 0,5 % der Gesamtlipidmenge dar. Aus diesem Grunde kann für den inhibitorischen Test nur 25 mg eingesetzt werden. Mit dieser Menge wird jedoch noch eine Hemmung von 40 % erreicht, was auch ungefähr erwartet werden kann, wenn man die Hemmkurve des Rohextraktes betrachtet.

Durch mehrere Dünnschichtchromatogramme mit verschiedenen Laufmitteln kann die Substanz nicht weiter aufgetrennt werden. Dies soll jedoch nicht der endgültige Beweis sein für das Vorliegen einer einheitlichen Substanz.

Tab. 4: Fließmittel zur Testung auf Einheitlichkeit

Fließmittel	Mischungsverhältnis
Petroleumbenzin(Kp40-60)/Diäthyläther/Eisessig	90:10:1
Petroleumbenzin(Kp40-60)/Diäthyläther/Eisessig	80:20:1
Petroleumbenzin(Kp40-60)/Diäthyläther/Eisessig	70:30:1
Petroleumbenzin(Kp40-60)/Diäthyläther/Eisessig	84:15:1
Petroleumbenzin(Kp50-70)/Diäthyläther/Eisessig	90:10:1
Petroleumbenzin(Kp50-70)/Diäthyläther/Eisessig	75:25:1
Petroleumbenzin(Kp60-80)/Diäthyläther/Eisessig	90:10:1
Petroleumbenzin(Kp60-80)/Diäthyläther/Eisessig	80:20:1
Petroleumbenzin(Kp60-80)/Diäthyläther/Eisessig	70:30:1
Petroleumbenzin(Kp40-60)/Äthylmethylketon/Eisessig	95:14:1
Petroleumbenzin(Kp40-60)/Äthylmethylketon/Eisessig	84:15:1
Benzol/Diäthyläther/Äthanol/Eisessig	50:40:2:0,2
Benzol/Diäthyläther/Äthanol/Eisessig	50:40:2:0,2
danach: Hexan/Diäthyläther	94:6
Diisopropyläther/Eisessig	96:4
danach:	
Petroleumbenzin(Kp40-60)/Diäthyläther/Eisessig	90:10:1
Chloroform/Methanol/Wasser	65:25:4
Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser	65:25:4:4
n-Propanol/Wasser	70:30
Eisessig/Wasser	90:10
Chloroform/Eisessig	96:4
Petroleumbenzin(Kp40-60)/Diisobutylketon /Eisessig	87:13:0,7

E) VERSÜCHE ZUR CHARAKTERISIERUNG DER INHIBITORISCH WIRKSAMEN LIPIDKOMPONENTE

I. Phospholipidnachweis

Es soll untersucht werden, ob es sich bei der isolierten Lipidkomponente um ein Phospholipid handelt. Das Lipid wird auf DC-Platten aufgetragen und in Kammern mit mehreren verschiedenen Fließmitteln gegeben. Hierzu eignen sich vor allem Mischungen von Chloroform und Methanol mit wenig Wasser.

Tab. 5: Fließmittel zur DC von Phospholipiden an Kieselgel

Fließmittel	Mischungsverhältnis
Chloroform/Methanol/Wasser	60:25:4
Chloroform/Methanol/Wasser	60:35:8
Chloroform/Methanol/Wasser	60:25:4
danach in zweiter Richtung:	
n-Butanol/Eisessig/Wasser	60:20:20
Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser	60:34:4:2
n-Propanol/Wasser	70:30

Zum Nachweis von Phospholipiden dienen die folgenden Sprühreagenzien, die auch in der Papierchromatographie Verwendung finden:

Ninhydrin-Reagenz

Aminophosphatide, Amine und Aminosäuren werden mit

diesem Reagenz angefärbt. Die DC-Platte wird mit einer 0,2%-igen Ninhydrin-Lösung in 95 ml Butanol und 5 ml 10%-iger Essigsäure besprüht und 20 min. im Trockenschrank erhitzt. Beim Vorhandensein von Phospholipiden erscheinen rot-violette Flecken auf weißem Grund.

Dragendorff-Reagenz

Dieses Reagenz dient zur Sichtbarmachung von Cholin-, -haltigen Phosphatiden. Bei positiver Reaktion treten nach Besprühen der Platte rot-orange Flecken auf.

Nachweis für alle Phosphatide.

Nach Besprühen der DC-Platte wird 2 min. mit einer Infrarotlampe im Abstand von 30 cm bestrahlt und anschließend 5-10 min. auf 110°C erhitzt.

Es zeigen sich bei positiver Reaktion blau-schwarze Flecken auf schwach grau gefärbtem Grund.

Fazit

Mit allen 3 Reagenzien kann kein Phospholipid in der isolierten Lipidkomponente nachgewiesen werden.

Die Reaktionen verlaufen negativ.

II. Alkalische Hydrolyse

Ein Gewichtsteil Kaliumhydroxid wird in einem Gewichtsteil destillierten Wassers gelöst und mit 4 Teilen Methanol verdünnt. Die Lipidprobe wird mit dieser Lösung im Verhältnis 1:10 versetzt und bleibt über Nacht stehen. Der größte Teil des Methanols

wird nach beendeter Verseifung bei 50°C im Vakuum abgedampft und der Rückstand mit der doppelten Menge Wasser verdünnt. Die Lösung wird durch unverseifbare Verbindungen trüb.

Glycerin Extraktion

Der unverseifbare Anteil wird mit Diäthyläther extrahiert und mit destilliertem Wasser neutral gewaschen. Nach Trocknung der Lösung über wasserfreiem Natriumsulfat und Verdampfen des Äthers wird die unverseifbare Lipidkomponente in Petroleumbenzin/Diäthyläther (9:1) gelöst und für den Hemmtest benutzt.

Darstellung der freien Fettsäuren

Die wässrige Lösung der Kaliumsalze höherer Fettsäuren, die von Neutralstoffen befreit ist, wird mit 5 N H_2SO_4 unter einer Ätherschicht angesäuert. Die damit freigesetzten Fettsäuren werden mit destilliertem Wasser gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach Verdampfen des Äthers werden die Fettsäuren für den Hemmtest in 40 ml Petroleumbenzin konserviert.

Ergebnis

Sowohl der verseifbare als auch der unverseifbare Teil des inhibitorisch wirksamen Lipids werden nach der üblichen Methode emulgiert und auf antilipolytische Wirkung getestet. Nach alkalischer Hydrolyse führt weder der verseifbare noch der unverseifbare Anteil der Lipidkomponente zu einer Verminderung der Lipaseaktivität.

F) SCHLUSSBEMERKUNG

Durch vorliegende Ergebnisse kann man sagen, daß auch der Ricinussamen einen antilipolytischen Wirkstoff besitzt, der auch in anderen fettreichen Pflanzensamen wie Mohn, Erdnuß, Soja und Raps enthalten ist. Der Inhibitor, der in reiner Form dargestellt werden kann, vermag die Lipaseaktivität in permanenter Weise um 64 % zu reduzieren. Es handelt sich bei dem Lipasehemmstoff höchstwahrscheinlich um ein Triglycerid. Eine genaue Charakterisierung der Struktur ist beim gegenwärtigen Stand nicht möglich.

Da durch Instillation in das Pankreasgangsystem in Gegenwart aktivierender Gallensäuren typische Pankreasnekrosen verursacht werden können, wird der Pankreaslipase ebenso wie der Phospholipase A große Bedeutung an der Entstehung der akuten Pankreatitis beigemessen. Deshalb ist für therapeutische Maßnahmen notwendig, nach Mitteln zu suchen, um die Aktivität der Pankreaslipase herabzusetzen.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Feuth, H.: Isolierung und Charakterisierung eines Lipase-Inhibitors aus *Arachis hypogaea*, Dissertation (1974)
- (2) Richterich, R.: Physiologie der Pankreassekretion, in Heinkel und Schön (1964)
- (3) Keidel, W.: Kurzgefaßtes Lehrbuch der Physiologie (1970)
- (4) Shhmidt, H.: Internist, 11. Jg. Heft 3, 105 (1970)
- (5) Schmidt, H., Creutzfeld, W.: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 72, 719 (1966)
- (6) Benzer, H., Blümel, G., Lill, H., Piza, F. in Heinkel und Schön: Zusammenhänge der experimentellen Pankreasnekrose mit der Proteolyse und der Antiproteolyse sowie mit Störungen der Blutgerinnung (1964)
- (7) Schmidt, H., Creutzfeld, W.: T. Gastroent. (1970)
- (8) Wanke, U.: Experimentelle Pankreatitis (1968)
- (9) Hochstraßer, K., Feuth, H., Werle, E.: Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. Bd. 353, S. 855-60 (1972)
- (10) Schmidt, H., Creutzfeld, W.: Scand. J. Gastrent. 4, 39 (1969)
- (11) Schmidt, H., Habermann, E.: Klin. Wschr. 45, 163 (1967)
- (12) Hafter, E.: Praktische Gastroenterologie, Stuttgart 1973
- (13) Lang, H., Helger, R., Hennrich, N.: Ärztl. Praxis, Enzyme in Diagnostik und Therapie, 18. Jg. Nr. 87, 2937-2960 (1966)
- (14) Kirsch, K.: Dtsch. med. Wschr. 94. Jg., 52, Das aktive Zentrum von Enzymen (1969)

- (15) Buddecke, E.: Grundriß der Biochemie,
2. Aufl. (1971)
- (16) Hoppe-Seyler-Thierfelder: Handbuch der
physiolog.- und patholog.-chem. Analyse, VI,
B, 877-921 (1966)
- (17) Desnuelle, P.: Biochimie, 53, 841 (1971)
- (18) Marchis-Mouren, G., Sarda, L., Desnuelle, P.:
Arch. Biochem. 83, 309 (1959)
- (19) Sarda, L., G. Marchis-Mouren et P. Desnuelle:
Biochim. biophys. Acta 21, 525 (1957)
- (20) Sarda, L., Desnuelle, P.: Biochim. biophys.
Acta 30, 513 (1958)
- (21) Desnuelle, P. und P. Savary: J. Lipid Res. 4,
369 (1963)
- (22) Rick, W.: Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.,
7. Jg., 530-539 (1969)
- (23) Randerath, K.: Dünnschicht-Chromatographie,
Weinheim, 2. Aufl. (1965)
- (24) Stahl, E.: Dünnschichtchromatographie,
2. Aufl. (1967)
- (25) Dane, Wille: Kleines chemisches Praktikum
- (26) Doerr, W., Diezel, P.B., Grözingen, K.H.,
Lasch, H.G., Nagel, W., Rossner, J.A.,
Wanke, U., Willig, F.:
Klin. Wschr. 43, 125 (1965)
- (27) Vogel, R., Trautschold, I., Werle, E.:
Natürliche Proteinase-Inhibitoren, Stutt-
gart 1966
- (28) Kraut, H., Frey, E.K., Werle, E.:
Z. physiol. Chem. 192, 1 (1936)
- (29) Kraut, H., Frey, E.K., Werle, E., Schultz, T.:
Z. physiol. Chem. 230, 259 (1934)
- (30) Werle, E.: Z.physiol. Chem. 338, 228 (1964)
- (31) Trautschold, I., Werle, E.:
Z. physiol. Chem. 325, 48 (1961)

- (32) Fritz, H., Hartwich, G., Werle, E.:
Z. physiol. Chem. 345, 150 (1966)
- (33) Fritz, H., Trautschold, I., Hartwich, G.,
Werle, E.: Fed. Europ. Biochem. Soc.
IInd Meeting, Wien 1965
- (34) Fritz, H., Schult, H., Neudecker, M., Werle, E.:
Angew. Chem. 78, 775 (1966)
- (35) Fritz, H., Fink, E., Gebhardt, M., Hochstraßer,
K., Werle, E.: Z. physiol. Chem. 350, 933
(1969)
- (36) Hochstraßer, K., Werle, E., Schramm, W., Fritz,
H., Schwarz, S.: Z. physiol. Chem. 350, 893
(1969)
- (37) Hochstraßer, K., Werle, E.: Z. physiol. Chem.
350, 249 (1969)
- (38) Hochstraßer, K.: Hemmung von Proteasen Inhibi-
toren 1. Int. Cong. for clin. chem. Geneva/
evion 1969
- (39) Hochstraßer, K., Werle, E.: Z. physiol. Chem.
249, (1969)
- (40) Hochstraßer, K., Schramm, W., Fritz, H.:
Z. physiol. Chem. 350, 893 (1969)
- (41) Rick, W.: Internist 11, 110 (1970)
- (42) Brockerhoff, H.: Biochem. Biophys. Acta 159
296 (1968)
- (43) Mendele, B., Myers, D.K., Ulydert, J.E., Ruys,
A.C., Buyn, W.M.D.: Brit. J. Pharmacol. 8,
217 (1953)
- (44) Desnuelle, P., Constantin, J., Baldy, J.:
Bull. Soc. Chem. Biol. 37, 285 (1955)
- (45) Balls, A.K., Matlack, M.B., Tucker, J.W.:
J. Biol. Chem. 122, 125 (1937)

DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. Karl Hochstraßer, möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas, für die Anregung zu dieser Arbeit und die Gewährung eines Arbeitsplatzes sehr herzlich danken.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. Herbert Feuth für die überaus wertvollen Ratschläge und Antworten auf die Fragen, mit denen ich jederzeit zu ihm kommen durfte, sehr herzlich bedanken.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die freundliche Beratung und Hilfe.

LEBENS LAUF

Am 21. Juli 1946 wurde ich, Harald Becker, in Offenbach als Sohn des Zahnarztes Dr. Heinrich Becker und seiner Ehefrau Rialotte, geb. Gebhardt, geboren. Von 1953 bis 1957 besuchte ich die Volksschule in Offenbach-Bieber. Die Reifeprüfung legte ich an dem neusprachlichen Gymnasium Dr. Richter in Kelkheim im Herbst 1966 ab. Bevor ich zum Studium der Zahnmedizin zum Sommersemester 1969 zugelassen wurde, leistete ich 18 Monate Wehrdienst ab. Nach bestandener naturwissenschaftlicher Vorprüfung im Oktober 1970 und zahnärztlicher Vorprüfung im Oktober 1972 beendete ich mein Studium mit dem Staatsexamen im Juli 1975.

